PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K 9/16, 9/50

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/19676**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Juni 1997 (05.06.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04701

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Oktober 1996 (30.10.96)

(30) Prioritätsdaten:
195 45 257.7 24. November 1995 (24.11.95) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: RÖSSLING, Georg [DE/DE]; Oranienburger Chaussee 60 C, D-13465 Berlin (DE). ALBAYRAK, Celál [DE/DE]; Paul-Lincke-Ufer 42/43, D-10999 Berlin (DE). TACK, Johannes [DE/DE]; Tharsanderweg 42, D-13595 Berlin (DE). SCHMITZ, Reinhard [DE/DE]; Pfalzburger Strasse 12, D-10719 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, IL, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: METHOD OF PRODUCING MORPHOLOGICALLY UNIFORM MICROCAPSULES AND MICROCAPSULES PRODUCED BY THIS METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MORPHOLOGISCH EINHEITLICHEN MIKROKAPSELN SOWIE NACH DIESEM VERFAHREN HERGESTELLTE MIKROKAPSELN

(57) Abstract

The invention concerns a method of producing morphologically uniform microcapsules containing peptides, proteins or other water-soluble biologically active substances as active substance, and microcapsules produced by this method with a charging degree of between 3 and 30 wt.% and a diameter of ≤ 8 μm. According to the invention, biodegradable polymers are dissolved in a halogen-free solvent or solution mixture and the buffered active substance solution, which has a pH of between 6.0 and 8.0, is dispersed in this solution. An aqueous solution containing a surfactant is then added to this W/O emulsion (W/O/W emulsion) and the solvent removed. The microcapsules produced by this method display no tendency to agglomerate. The encapsulation efficiency of the method is between 90 and 95 %.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von morphologisch einheitlichen Mikrokapseln enthaltend Peptide, Proteine oder andere wasserlösliche biologisch aktive Substanzen als Wirkstoff sowie nach diesem Verfahren hergestellte Mikrokapseln mit einem Beladungsgrad zwischen 3 bis 30 Gew.-% und einem Durchmesser ≤ 8 μm. Erfindungsgemäß werden bioabbaubare Polymere in einem halogenfreien Lösungsmittel oder -gemisch gelöst, in diese Lösung wird die gepufferte Wirkstofflösung, die einen pH-Wert zwischen 6,0 bis 8,0 besitzt, dispergiert. Anschließend wird zu dieser W/O-Emulsion eine wäßrige Lösung enthaltend eine oberflächenaktive Substanz zugesetzt (W/O/W-Emulsion) und das Lösungsmittel entfernt. Die mit diesem Verfahren hergestellten Mikrokapseln zeigen keine Agglomerationsneigung. Die Verkapselungseffizienz des Verfahrens liegt bei 90 bis 95 %.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von morphologisch einheitlichen Mikrokapseln sowie nach diesem Verfahren hergestellte Mikrokapseln

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von morphologisch einheitlichen Mikrokapseln, die Peptide, Proteine oder andere wasserlösliche biologisch aktive Substanzen als Wirkstoffe enthalten sowie nach diesem Verfahren hergestellte Mikrokapseln.

Bekanntermaßen stellen Peptide und Proteine Wirkstoffe mit großer Pharmakodynamik dar, die jedoch bei oraler Applikation wegen ihrer Hydrolyseempfindlichkeit im sauren Milieu des Magens sowie enzymatischen Abbau zersetzt und damit teilweise inaktiviert werden, so daß sich ihre Wirksamkeit im Gastrointestinaltrakt erheblich verringert.

Eine schnelle Inaktivierung von Proteinen und Peptiden ist jedoch auch nach parenteraler und speziell nach intravenöser Applikation aufgrund der oft sehr kurzen Halbwertszeit zu beobachten. Dies bedeutet, daß trotz großer Pharmakodynamik und theoretisch geringer therapeutischer Dosierungen Mehrfachgaben hoher Dosierungen notwendig werden können, die eine große Belastung für den Patienten bedeuten.

Geeignete Formulierungen,die die genannten Nachteile vermeiden, sind Depotsysteme in Form von Polymermikrokapseln oder Polymernanokapseln, die auch für Peptide zahlreich bekannt und in der Literatur beschrieben sind.

Sie besitzen die Vorteile, daß

- Peptide und Proteine vor rascher Inaktivierung geschützt sind,
- geringere Dosierungen pharmakologisch wirksam sind,

-Mehrfachgaben reduziert werden können,

-eine kontrollierte Freisetzung von Peptiden und Proteinen prinzipiell möglich ist,

-die verkapselten Wirkstoffe zielgerichtet transportiert und

-unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden können.

Die bekannten Verfahren zur Mikro - oder Nanoverkapselung von wasserlöslichen Substanzen können wie folgt eingeteilt werden:

-Koazervation bzw. Emulsionsphasentrennung

-Verkapselung durch Sprühtrocknung

-Solvent - Evaporation in organischer oder wäßriger Phase.

Alle Verfahren beinhalten die Einbettung der Wirkstoffe in eine bioabbaubare Polymermatrix bzw. Copolymermatrix.

Aus der Literatur bekannte Polymere für diesen Zweck sind Polyamide, Polyanhydride, Polyester, Polyorthoester, Polyacetate, Polylactone, Polyorthocarbonate u. a. Vor allem haben bisher Polylactid-co-Glycolid-Polymere Anwendung gefunden.

So sind z.B. aus US 4.675.189 (Syntex Inc.), US 4.835.139 (Debiopharm S.A.) und EP 302 582 B1 (Southern Research Inst.) pharmazeutische Zusammensetzungen wasserlöslicher Peptide und Proteine in Kapselform bekannt, die auf der Basis der Koazervation bzw. Emulsionsphasentrennung hergestellt wurden.

Gemäß dieser Offenbarung werden Verfahren beschrieben, bei denen das verwendete Copolymer, vorzugsweise Poly- (Lactid-co-Glycolid)-Polymer, in einem halogenierten organischen Lösungsmittel, bevorzugt Dichlormethan, gelöst wird, und in

diese Lösung eine wäßrige Peptidlösung dispergiert wird. Danach wird ein sogenanntes Koazervations-Agenz zugesetzt. Das Koazervations-Agenz ist in dem organischen Lösungsmittel löslich, das Polymer ist jedoch unlöslich im Koazervations-Agenz, wodurch es zur Präzipitation des Polymeren unter Einschluß der dispergierten Polypeptide kommt. Als Koazervations-Agenz wird zur Phasentrennung üblicherweise Silikonöl eingesetzt. Nach Zugabe des Silikonöls muß außerdem noch eine große Menge Heptan zugegeben werden, das die Härtung der Mikrokapseln bewirkt.

Die Verkapselungseffizienz dieser Methode liegt bei ca. 70% (US 4.835.136). Die hergestellten Mikrokapseln weisen einen Durchmesser von 1 bis 500 µm auf, gemäß der Beispiele vorzugsweise 10 bis 50µm.

Die Nachteile dieses Verfahrens bestehen neben der Verwendung toxikologisch problematischer Mittel wie Dichlormethan, Heptan und Silikonöl auch in der Notwendigkeit des Einsatzes großer Lösungsmittelmengen, die aus der Verkapselung mittels Koazervations- Agentien, wie Silikonöl, resultiert.

Ein in EP-A 315875 (Hoechst AG) beschriebenes Verfahren zur Herstellung bioabbaubarer Mikrokapseln von wasserlöslichen Peptiden und Proteinen basiert auf dem Sprühtrocknungsverfahren, bei dem eine wäßrige Peptid- oder Proteinlösung in einer organischen Polymerlösung emulgiert und diese Emulsion sprühgetrocknet wird.

Als biologisch abbaubares Polymer wird eine Mischung aus Polyhydroxybuttersäure und Poly (Lactid-co-Glycolid) Polymer im Mischungsverhältnis zwischen 99:1 bis 20:80 eingesetzt.
Das Peptid oder Protein liegt in mikronisierter Form oder in wäßriger Lösung vor. Als Lösungsmittel kommen Chloroform, Dichlormethan, DMF oder ein Lösungsmittelgemisch aus Wasser /Ethanol /Chloroform in

Betracht. Gemäß den Beispielen wird Chloroform eingesetzt. Die Sprühtrocknung erfolgt bei Temperaturen zwischen vorzugsweise 45 bis 95°C.

Nachteilig an diesem Verfahren ist die potentielle Explosionsgefahr bei Verwendung nichthalogenierter Lösungsmittel und der gleichzeitigen Anwendung höherer Temperaturen beim Trocknungsverfahren. Andererseits führt der Einsatz nichtentflammbarer Lösungsmittel wie Dichlorethan zu toxikologisch bedenklichen Restlösemittelkontaminationen im Endprodukt. Daneben zeigen sprühgetrocknete Mikrokapseln prinzipiell eine starke Agglomerationsneigung, es entstehen Agglomerate von ca. 100 µm Größe.

Nach dem "Solvent - Evaporation - Verfahren" hergestellte Mikropartikel sind in zwei kanadischen Patentanmeldungen CA 2.100.925 (Rhone-Merieux) und CA 2.099.941 (Tanabe Seiyaku Co.) beschrieben.

Üblicherweise wird bei dieser Methode die wäßrige Peptid- oder Proteinlösung in einer organischen Polymerlösung dispergiert, oder es werden Wirkstoffkristalle in der Polymerlösung suspendiert. Nach Zugabe einer zweiten wäßrigen Phase mit einer grenzflächenaktiven Substanz wird das Polymerlösungsmittel verdampft.

Diese Methode ist sehr variabel und es werden normalerweise W/O oder komplexe W/O/W-Emulsionen hergestellt.

Gemäß CA 2.099.941 werden wasserlöslicher Wirkstoff und bioabbaubares Polymer zuerst in einem Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch gelöst, in dem sie beide löslich sind. Anschließend wird dieses Lösungsmittel entfernt und die entstandene feste Dispersion in einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel gelöst. Die resultierende Lösung (Ölphase) wird in einer wäßrigen Phase emulgiert, so daß eine W/O - Emulsion entsteht.

Zuletzt wird das organische Lösungsmittel der Ölphase dieser Emulsion verdampft.

Konkrete Beispiele der Patentschrift betreffen Poly-(Lactid-co-Glycolid)-Polymer (PLGA) als Matrix und Thyreotropin freisetzendes Hormon (TRH) oder seine Derivate als Wirkstoff, die zuerst in einem Gemisch aus Acetonitril/Ethanol und ggf. Wasser, oder nur Acetonitril, oder aus Acetonitril und wäßriger Gelatine, oder aus Dichlormethan und Ethanol gelöst werden.

Als organische Lösungsmittel zur Lösung der festen Dispersion finden Dichlormethan oder Chloroform Anwendung. Eine wäßrige Polyvinyalkohol-Lösung stellt die wäßrige Phase dar.
Die Größe der Mikrokapseln liegt bei einem Durchmesser von 1 bis 100 µm, gemäß der konkreten Beispiele bei ca. 50 µm bis <100 µm.

Gemäß CA 2.100.925 werden Mikrokapseln von LHRH-Hormon und Analoga durch vorheriges Dispergieren des LHRH-Hormons in Pulverform in zwei organischen Lösungsmitteln hergestellt, wobei das eine Lösungsmittel (genannt Dispersionslöungsmittel) das Herstellen einer homogenen Suspension des pulverisierten Hormons durch einfaches Rühren ermöglicht. Das zweite Lösungsmittel ist leicht mit Wasser mischbar und macht damit die Mikrodispersion der organischen Phase in der wäßrigen Phase möglich.

Als zweites Lösungsmittel wird Dichlormethan oder alternativ Chloroform verwendet. Die Kapseln weisen einen Durchmesser zwischen 1 bis 250 µm auf. Vorzugsweise sind die Kapseln größer als 50 - 60 µm.

Die Morphologie der so hergestellten Mikrokapseln ist ebenfalls sehr unterschiedlich. Wie oben bereits ausgeführt sind die verwendeten halogenierten Lösungsmittel

toxikologisch bedenklich. Daneben benötigt dieses Verfahren auch größere Mengen grenzflächenaktiver Substanzen.

Aufgabe der Erfindung war es, ein einfaches und schonendes Verfahren zur Herstellung morphologisch einheitlicher, nicht agglomerierender Mikrokapseln unter Verwendung von toxikologisch unbedenklichen Lösungsmitteln zu entwickeln, das eine Verkapselungseffizienz von mindestens 85%, vorzugsweise über 90 %, aufweisen und Mikrokapseln im Größenbereich von 200 nm bis 500µm mit hohem Beladungsgrad liefern soll. Außerdem soll das Verfahren ein "scaling up" ermöglichen.

Die Aufgabe der Erfindung wird überraschend einfach mittels der "Induced Phase Transition"-Methode gelöst, welche ausgeführt wird indem ein für die Mikrokapselherstellung übliches Polymer wie ein Polyester aus Hydroxycarbonsäuren oder ein Blockpolymer aus Polyestern von Hydroxycarbonsäuren und Polyethylenglykol (PEG) in einem halogenfreien, nicht oder partiell mit Wasser mischbaren Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gelöst wird und in diese Lösung die gepufferte Wirkstofflösung, die einen pH-Wert zwischen 6,0 - 8,0 hat, dispergiert wird. Durch Homogenisieren entsteht eine stabile W/O-Emulsion, zu der unter Rühren eine wäßrige Lösung enthaltend eine oberflächenaktive Substanz oder ein Gemisch oberflächenaktiver Substanzen als äußere Phase zugesetzt wird, so daß eine dreiphasige W/O/W-Emulsion erhalten wird. Nachfolgend wird das Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch mit üblichen Methoden entfernt, vorzugsweise im Vakuum und/oder Luft/Stickstoffstrom. Die Mikrokapseln werden aufkonzentriert und ggf. gefriergetrocknet.

Die Partikelgröße wird dabei über die Rührgeschwindigkeit gesteuert, wobei kleinere Partikel (≤ 8µm) - wie sie benötigt werden falls das Produkt für eine intravenöse

Applikation bestimmt ist - bei höheren Rührgeschwindigkeiten erhalten werden.

Gewünschtenfalls werden die Mikrokapseln nach Entfernung des Lösungsmittels zusätzlich einer "cross-flow" Filtration unterzogen, wodurch sie von restlichem Tensid und Restlösemittel-Anteilen befreit werden. Dadurch gelingt es den "initial burst", d.h. eine hohe Wirkstoffabgabe unmittelbar nach der Applikation (durch an der Partikeloberfläche anhaftenden Wirkstoff), zu verringern bzw. zu vermeiden.

Zur Lyophilisation werden gegebenenfalls Kryoprotektoren wie Zucker, Zuckeralkohole oder Polyvinylpyrrolidonderivate zugesetzt.

Bevorzugte Polyester von Hydroxycarbonsäuren, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, sind:

Polyglycolide (PGA)und Copolymere von Glycoliden wie Glycolid/Lactid Copolymere (PGA/PLLA) oder Glycolid/Trimethylencarbonat Copolymere (PGA/TMC); L-Polylactide (PLA) und Stereocopolymere von Polylactiden wie Poly-L-Lactid (PLLA), Poly-DL-Lactid Copolymere und L-Lactid /DL-Lactid Copolymere; Copolymere von PLA wie Lactid/Tetramethylglycolid Copolymere, Lactid/ δ-Valerolacton Copolymer und Lactid/ε-Caprolacton Copolymer; Poly-β-hydroxybutyrat (PHBA), PHBA/ β-Hydroxyvalerat Copolymere (PHBA/HVA), Poly-β-hydroxypropionat (PHPA), Poly-p-dioxanon (PDS), Poly-δ-valerolacton, hydrophobisierte Polysaccharide, - Hyaluronsäure, - Dextrane oder hydrophobisiertes Amylopektin und Poly-ε-caprolacton.

Als Blockcopolymere von Polyestern von Hydroxycarbonsäuren und linear- oder Star-Polyethylenglykol (PEG) können in dem erfindungsgemäßen Verfahren die nachfolgend genannten Anwendung finden:

AB-Blockcopolymere aus PLA und PEG, ABA-TriblockCopolymere aus PLA-PEG-PLA, S(3)-PEG-PLA Blockcopolymere und S(4)-PEG-PLA Blockcopolymere.

Bevorzugt wird gemäß der Erfindung das Polymer Resomer® 505 insbesondere Resomer® RG-756 oder Resomer® RG-858 eingesetzt.

Resomer® ist eine Marke der Firma Böhringer Ingelheim Es handelt sich dabei um ein (DL-Lactid-co-glycolid)-Polymer.

Erfindungsgemäß bevorzugte halogenfreie Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische sind Aceton, Ethanol, Alkylacetate wie Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl- oder Butylacetat, Alkylformiate wie Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl- oder Butylformiat, Triacetin, Triethylcitrat und/oder C_1-C_4 - Alkyllactate z. B. Methyl- oder Ethyllactat.

Besonders bevorzugt werden Ethylacetat, Isopropylacetat und Propylformiat eingesetzt.

Gepufferte Lösungen im Sinne der Erfindung sind wäßrige Lösungen von Peptiden, Proteinen bzw. von deren physiologisch verträglichen Salzen oder von anderen wasserlöslichen biologisch aktiven Substanzen, die vorzugsweise mit einer Tris (hydroxymethyl) aminomethanlösung oder einer Phosphatpufferlösung auf einen pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0, vorzugsweise pH 6,5 bis 7,4, eingestellt werden.

Ein weiterer erfindungsgemäß eingesetztbarer Puffer ist der Citratpuffer, wobei die Pufferkonzentrationen im allgemeinen im Bereich von 5mmol/l bis 300 mmol/l liegen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können beliebige wasserlösliche Peptide bzw. Proteine verkapselt werden. Insbesondere geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren

zur Verkapselung von Humanserumalbumin, Insulin, Interferone und LHRH-Antagonisten oder deren Analoga.

Ganz besonders vorteilhaft können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren morphologisch einheitliche Mikrokapseln von Humanserumalbumin, Insulin, Interferonen und den nachfolgend genannten Peptiden hergestellt werden:

a) DesA(2)Nal-beta-Ala-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH_2,

b) DesA(2)Nal-Gly-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH_2,

c) Ac-DNal-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DLys(Mor)-Leu-Lys(Mor)Pro-DAla-NH_2.

Die Bedeutungen von DesA(2)Nal und D-Cit und die chemischen Strukturen der Peptide a) bis c) sind in Figur 1 bzw. 2 aufgeführt.

Im Sinne der Erfindung werden als oberflächenaktive Substanzen bevorzugt Substanzen aus der Poloxamere® Gruppe, Polyethylenglycol Alkylether, Polysorbate (Tween®, Span®), Saccharoseester (Sisterna®, the Netherlands), Saccharoseester (Ryoto sugar ester, Tokyo), Gelatine, Polyvinylpyrrolidon, Fettalkoholpolyglycosid, Charps, Charpso, Decyl-β-D-Glycopyranosid, Decyl-β-D-Maltopyranosid, Dodecyl-β-D-Maltopyranosid, Natrium-oleat, Poloxamine® Gruppe, Polyethylenglykol, Polyvinyalkohol, polyoxyethylierte Fettsäureether (Brij®),Triton X 100 oder deren Gemische.

Bevorzugt finden Polyvinylalkohol, Brij®, Poloxamere®, Poloxamine® und Tween® Anwendung.

Gegenstand der Erfindung sind auch morphologisch einheitliche Mikrokapseln, die nach dem genannten Verfahren

hergestellt werden und einen Durchmesser von 200nm bis 500µm, vorzugsweise zwischen 0,2 bis 8 µm aufweisen.

Aufgrund der günstigen Konstellation von Polymer und Lösungsmittel kommt es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zu keiner Bildung von Agglomeraten der Mikrokapseln.

So zeigen Figuren 3 und 4 lichtmikroskopische Aufnahmen der erfindungsgemäßen Mikrokapseln hergestellt nach Beispiel 10 (Fig. 3) bzw. nach Beispiel 15 (Fig. 4). Ein Millimeter in der Abbildung entspricht 1 µm in Realität. Die Aufnahmen zeigen deutlich die einheitliche Morphologie, Partikelagglomerate liegen nicht vor.

Die Verkapselungseffizienz des Verfahrens liegt bei mindestens 85%, vorzugsweise werden Verkapselungseffizienzen zwischen 90 - 95 % erreicht. Als Verkapselungseffizienz ist die Masse des verkapselten Wirkstoffes · 100/Masse des eingesetzten Wirkstoffes zu verstehen. Der Beladungsgrad der hergestellten Mikrokapseln liegt zwischen 3 bis 30 % (Beladungsgrad = Wirkstoffmasse · 100 / Wirkstoffmasse + Polymermasse).

Anschließend soll die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie darauf einzuschränken.

Beispiel 1

1,7 g des Polymers Resomer ® RG-756 werden in 29 ml Ethylaceat gelöst und in ein Stahlgefäß (Höhe 11,5 cm, Innendurchmesser 8 cm) überführt. Anschließend werden 3 ml einer wäßrigen, 200 mg Humanalbumin enthaltenden, 5 mmolaren Tris(hydroxymethyl)aminomethanlösung (pH 7,4) mit Hilfe eines mechanischen Rührers (Dispermat-FT, VMA-Getzmann GmbH, 5cm Dissolverscheibe) in der Polymerlösung 6 min bei 10000 U/min unter Raumtemperatur dispergiert. Zu der entstandenen W/O- Emulsion werden unter Rühren (8000 U/min) 45 ml einer wäßrigen Lösung, bestehend aus einer 2 % igen Polyvinylalkohollösung (Molekulargewicht 9000 - 10000, Aldrich) gegeben. Nach einer Dispergierzeit von 10 sec. wird die W/O/W-Emulsion in einen 500 ml Dreihalskolben überführt und mittels KPG-Rührer gerührt. Das Lösungsmittel Ethylacetat wird dann unter 20°C durch Anlegen eines Vakuums (900 mbar), Stickstoff- oder Lufteinleitung entfernt. Nach 5 h wird die Suspension mit 5 l Wasser oder einer wäßrigen Lösung gewaschen und auf ein gewünschtes Suspensionsvolumen eingeengt. Es wird eine "cross flow" Filtration mittels eines Sartocon Mini ® (Sartorius AG, Göttingen) Systems durchgeführt. Die lösungsmittel- und annähernd emulgatorfreie Suspension wird mit einem Kryoprotektor (beispielsweise mit einem Zucker, Zuckeralkohol oder Polyvinylpyrrolidonderivat) versetzt, möglichst schnell, beispielsweise mit flüssigem Stickstoff, eingefroren und gefriergetrocknet.

Das mit Wasser oder mit einer wäßrigen Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem Humanalbumingehalt von 9 % (Humanalbuminmasse · 100 / Humanalbuminmasse + Polymermasse = Beladungsgrad) und sie besitzen einen Durchmesser von 0,2 bis 8 µm. Die Verkapselungseffizienz beträgt 86 %.

Beispiel 2

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei 1,7 g Resomer ® RG-756 nicht in 29 ml Ethylacetat, sondern in 40 ml Methylacetat gelöst werden.

Beispiel 3

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei statt 1,7 g des Polymers Resomer ® RG-756 1,1 g des Polymers Resomer ® RG-858 verwendet wird.

Beispiel 4

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei statt 1,7 g des Polymers Resomer ® RG-756 3,0 g des Polymers Resomer ® RG-858 verwendet werden.

Beispiel 5

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei statt einer 2 % PVA Lösung eine 2 % Brij ® 35 Lösung verwendet wird.

Beispiel 6

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei statt einer 2 % PVA Lösung eine 2 % Brij ® 96 Lösung verwendet wird.

Beispiel 7

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei statt einer 2 % PVA Lösung eine 2 % Tween ® 20 Lösung verwendet wird.

Beispiel 8

1,1 g des Polymers Resomer ® RG-858 werden in 29 ml Ethylacetat gelöst und in ein Stahlgefäß (Höhe 11,5 cm, Innendurchmesser 8 cm) überführt.
Anschließend werden 7 ml einer 50 mg des Peptides DesA(2)Nal-beta-Ala-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH_2 (Peptid a) und 2 ml Ethanol enthaltenden, 5 mmolaren Tris (hydroxymethyl) aminomethanlösung (pH 7,4) mit Hilfe eines mechanischen Rührers (Dispermat-FT, VMA-Getzmann GmbH, 5 cm Dissolverscheibe) in der Polymerlösung 6 min bei 10000 U/min unter Raumtemperatur dispergiert. Zu der entstandenen W/O- Emulsion werden unter Rühren (8000 U/min) 45 ml einer wäßrigen Lösung, bestehend aus einer 2%igen Polyvinyalkohollösung (Molekulargewicht 9000-10000, Aldrich) gegeben. Nach einer Dispergierzeit von 10 sec. wird die W/O/W-Emulsion in einen 500 ml Dreihalskolben überführt und mittels KPG-Rührer gerührt. Das Lösungsmittel Ethylacetat wird dann unter 20°C durch Anlegen eines Vakuums (900 mbar), Stickstoff- oder Lufteinleitung entfernt. Nach 5 h wird die Suspension mit 5 l Wasser oder einer wäßrigen Lösung gewaschen und auf ein gewünschtes Suspensionsvolumen eingeengt. Es wird eine "cross flow" Filtration mittels eines Sartocon Mini ® (Sartorius AG, Göttingen) Systems mit einer Polyolefinmembran (cutoff 0,2 µm) durchgeführt. Die lösungsmittel- und annähernd emulgatorfreie Suspension wird mit einem Kryoprotektor (beispielsweise mit einem Zucker, Zuckeralkohol oder Polyvinylpyrrolidonderivat) versetzt, möglichst schnell, beispielsweise mit flüssigem Stickstoff, eingefroren und gefriergetrocknet.

Das mit Wasser oder mit einer wäßrigen Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem Wirkstoffgehalt von 4 %. Die Mikrokapseln besitzen einen Durchmesser von 0,2 bis 8 µm. Die Verkapselungseffizienz beträgt 93 %.

Beispiel 9

1,1 g des Polymers Resomer ® RG-858 werden in 29 ml Ethylacetat gelöst und in ein Stahlgefäß (Höhe 11,5 cm, Innendurchmesser 8 cm) überführt. Anschließend werden 5 ml einer wäßrigen, 48 mg des Peptids DesA(2)Nal-Gly-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH_2 (Peptid b) enthaltenden, 5 mmolaren Tris(hydroxymethyl)amino-methanlösung (pH 7,4) mit Hilfe eines mechanischen Rührers (Dispermat-FT, VMA-Getzmann GmbH, 5 cm Dissolverscheibe) in der Polymerlösung 6 min bei 10000 U/min unter Raumtemperatur dispergiert. Zu der entstandenen W/O-Emulsion werden unter Rühren (8000 U/min) 45 ml einer wäßrigen Lösung, bestehend aus einer 2 %igen Polyvinylalkohollösung (Molekulargewicht 9000-10000, Aldrich) gegeben. Nach einer Dispergierzeit von 10 sec. wird die W/O/W-Emulsion in einen 500 ml Dreihalskolben überführt und mittels KPG-Rührer gerührt. Das Lösungsmittel Ethylacetat wird dann unter 20 °C durch Anlegen eines Vakuums (900 mbar), Stickstoff- oder Lufteinleitung entfernt. Nach 5 h wird die Suspension mit 5 l Wasser oder einer wäßrigen Lösung gewaschen und auf ein gewünschtes Suspensionsvolumen eingeengt. Vorteilhaft ist der Einsatz einer "cross flow" Filtration, beispielsweise mit einem Sartocon Mini ® (Sartorius AG, Göttingen) System mit einer Polyolefinmembran (cutoff 0,2 µm). Die lösungsmittel- und annähernd emulgatorfreie Suspension kann mit einem Kryoprotektor (beispielsweise mit einem Zucker, Zuckeralkohol oder Polyvinylpyrrolidonderivat) versetzt werden und wird möglichst schnell, beispielsweise mit flüssigem Stickstoff, eingefroren und gefriergetrocknet.

Das mit Wasser oder mit einer wäßrigen Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem Wirkstoffgehalt von 4 %. Die Mikrokapseln besitzen einen Durchmesser von 0,2 bis 8 µm. Die Verkapselungseffizienz beträgt 95,7 %.

Beispiel 10

1,1 g des Polymers Resomer ® RG-858 werden in 30 ml Propylformiat gelöst und in ein Stahlgefäß (Höhe 11,5 cm, Innendurchmesser 8 cm) überführt. Anschließend werden 5 ml einer wäßrigen, 50 mg des LHRH Antagonisten Ac-DNal-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DLys(Mor)-Leu-Lys(Mor)Pro- DAla-NH_2 (Peptid c) enthaltenden, 5 mmolaren Tris(hydroxymethyl)aminomethanlösung (pH 7,0) mit Hilfe eines mechanischen Rührers (Dispermat-FT, VMA-Getzmann GmbH, 5 cm Dissolverscheibe) in der Polymerlösung 6 min bei 10000 U/min unter Raumtemperatur dispergiert. Zu der entstandenen W/O Emulsion werden unter Rühren (8000 U/min) 45 ml einer wäßrigen Lösung, bestehend aus einer 2 % igen Polyvinylalkohollösung (Molekulargewicht 9000-10000, Aldrich), gegeben. Nach einer Dispergierzeit von 10 sec. wird die W/O/W-Emulsion in einen 500 ml Dreihalskolben überführt und mittels KPG-Rührer gerührt. Das Lösungsmittel Propylformiat wird dann unter 20 °C durch Anlegen eines Vakuums (900 mbar), Stickstoff- oder Lufteinleitung entfernt. Nach 5 h wird die Suspension mit 5 l Wasser oder einer wäßrigen Lösung gewaschen und auf ein gewünschtes Suspensionsvolumen eingeengt. Es erfolgt eine "cross flow" Filtration mit einem Sartocon Mini ® (Sartorius AG, Göttingen) System mit einer Polyolenfinmembran (cutoff 0,2 µm). Die Lösungsmittel- und annähernd emulgatorfreie Suspension wird möglichst schnell mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet.

Das mit Wasser oder mit einer wäßrigen Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem Wirkstoffgehalt von 3,9 %, und die Mikrokapseln besitzen einen Durchmesser von 0,2 bis 8 µm. Die Verkapselungseffizienz beträgt 90,7 %.

Beispiel 11

1,5 g des Polymers Resomer ® RG-858 werden in 30 ml Isopropylacetat gelöst und in ein Stahlgefäß (Höhe 11,5 cm, Innendurchmesser 8 cm) überführt. Anschließend werden 5 ml einer wäßrigen, 50 mg LHRH Antagonist wie Beispiel 10 enthaltenden, 5 mmolaren Tris (hydroxymethyl) aminomethanlösung (pH 7,0) mit Hilfe eines mechanischen Rührers (Dispermat-FT, VMA-Getzmann GmbH, 5 cm Dissolverscheibe) in der Polymerlösung 6 min bei 10000 U/min unter Raumtemperatur dispergiert.
Zu der entstandenen W/O-Emulsion werden unter Rühren (8000 U/min) 45 ml einer wäßrigen Lösung, bestehend aus einer 2 % igen Polyvinylalkohollösung (Molekulargewicht 9000-10000, Aldrich) gegeben. Nach einer Dispergierzeit von 10 sec. wird die W/O/W-Emulsion in einen 500 ml Dreihalskolben überführt und mittels KPG-Rührer gerührt. Das Lösungsmittel Isopropylacetat wird dann unter 20 °C durch Anlegen eines Vakuums (900 mbar), Stickstoff- oder Lufteinleitung entfernt. Nach 5 h wird die Suspension mit 5 l Wasser oder einer wäßrigen Lösung gewaschen und auf ein gewünschtes Suspensionsvolumen eingeengt. Es wird eine "cross flow" Filtration mit einem Sartocon Mini ® (Sartorius AG, Göttingen) System mit einer Polyolefinmembran (cutoff 0,2 µm) durchgeführt und die Lösungsmittel- und annähernd emulgatorfreie Suspension wird lyophilisiert.

Das mit Wasser oder mit einer wäßrigen Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem Wirkstoffgehalt von 2,9 % und die Mikrokapseln besitzen einen Durchmesser von 0,2 bis 8 µm. Die Verkapselungseffizienz beträgt 90,6 %.

Beispiel 12

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei die 5 mmolare Tris(hydroxymethyl)aminomethanlösung (pH 7,0) durch eine 5 mmolare Phosphatpufferlösung (PBS, pH 7,2) ersetzt wird.

Beispiel 13

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei statt 200 mg HSA gelöst in 3 ml Trispuffer (pH = 7,4) 750mg HSA gelöst in 5 ml Trispuffer (pH = 7,4) eingesetzt wird.

Das in Wasser oder wäßrigen Lösungen resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem HSA-Gehalt von 30%. Die Verkapselungseffizienz beträgt 90,9%.

Beispiel 14

Es wird wie in Beispiel 13 verfahren, wobei anstelle der 2 %igen Polyvinylalkohollösung eine 2 %iger Poloxamer F 127 Lösung eingesetzt wird.

Beispiel 15

Es wird wie in Beispiel 13 verfahren, wobei anstelle der 2 %igen Polyvinylalkohollösung eine 2 %iger Poloxamin T 707 Lösung eingesetzt wird.

Beispiel 16

Es wird wie in Beispiel 13 verfahren, wobei anstelle der 2 %igen Polyvinylalkohollösung eine 2 %iger Poloxamin T 908 Lösung eingesetzt wird.

Beispiel 17

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei 200 mg HSA durch 200 mg Insulin (Human, Recombinant (pfs), Sigma Chemie Nr. I 0259) ersetzt werden.

Beispiel 18

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei 200 mg HSA durch 200 mg Interferon (Human Leukocyte (pfs)(α-IFH, Le), Sigma Chemie Nr. I 1008) ersetzt werden.

Beispiel 19

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei 200 mg HSA durch 200 mg Insulin (Human, gamma (pfs)(γ-IFN), Sigma Chemie Nr. I 6507) ersetzt werden.

Beispiel 20

120 mg Insulin werden in 0.8 ml HCl (0,1 N) gelöst und mit 2 ml NaCl-Lösung (0,9 %) versetzt. Anschließend der pH-Wert der Lösung mit NaOH (0,1 N) auf 6-7 eingestellt. Diese Lösung wird zu einer Lösung von 500 mg Polymer RG-858 in 10 ml Ethylacetat gegeben und anschließend mit Ultraturax (bei 10.000-15.000 UPM) 3-4 Minuten gerührt. Danach werden unter Rühren 50 ml einer 2 %igen wäßrigen Polaxamin T707 Lösung zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wird die Suspension in einen Dreihals-Kolben, der mit einem Rührer versehen ist, überführt. Durch Anlegen eines Vakuums wird unter Rühren das Lösungsmittel (Ethylacetat) entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in einer Cross-flow Filtration (Sartocon Mini® Sartorius AG, Göttingen) mit 5 Litern Wasser gewaschen. Der nahezu lösungsmittel- und tensidfreie

Mikrokapseln enthaltende Rückstand wird, gegebenenfalls unter Zugabe eines Kyroprotektors, schnell eingefroren und gefriergetrocknet.

Das mit Wasser oder mit einer wäßrigen Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem Beladungsgrad von 15 Gewichtsprozent.

Beispiel 21

Es wird wie in Beispiel 20 verfahren, wobei anstelle der 2 %igen Polaxamin T707 Lösung, eine 2 %ige Polaxamer -407 (F127) Lösung eingesetzt wird.

Der Beladungsgrad der erhaltenen Mikrokapseln beträgt 17%.

Beispiel 22

Es wird wie in Beispiel 20 verfahren, wobei anstelle der 2 %igen Polaxamin T707 Lösung, eine 2 % ige Polaxamer-188 (F68) Lösung eingesetzt wird.

Der Beladungsgrad der erhaltenen Mikrokapseln beträgt 16%.

Beispiel 23

Es wird analog zu Beispiel 20 verfahren. Jedoch werden hier 700 mg Polymer und 223 mg Insulin eingesetzt. Das in Wasser oder einer wäßrigen Lösung resuspendierte Lyophilisat enthält Mikrokapseln mit einem Insulingehalt von 20 %.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von morphologisch einheitlichen Mikrokapseln aus bioabbaubaren Polymeren oder Copolymeren, die Peptide, Proteine oder andere wasserlösliche biologisch aktive Substanzen als Wirkstoff enthalten ,

 dadurch gekennzeichnet, daß

 - Polyester von Hydroxycarbonsäuren oder Blockcopolymere aus Polyestern von Hydroxycarbonsäuren und Polyethylenglykol in einem halogenfreien, nicht oder partiell mit Wasser mischbaren Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gelöst werden,
 - in diese Lösung die gepufferte Wirkstofflösung, die einen pH-Wert zwischen 6,0 bis 8,0 besitzt, dispergiert wird,
 - anschließend zu dieser W/O-Emulsion eine wäßrige Lösung enthaltend eine oberflächenaktive Substanz oder ein Gemisch oberflächenaktiver Substanzen zugesetzt wird und
 - zuletzt das Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch in üblicher Art und Weise entfernt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

 dadurch gekennzeichnet,

 daß als halogenfreie Lösungsmittel Aceton, Ethanol; C_1-C_4-Alkylacetate, Triacetin, Triethylcitrat, C_1-C_4-Alkylformiate und C_1-C_4-Alkyllactate oder deren Gemische eingesetzt werden.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß als halogenfreie Lösungsmittel Methylacetat, Ethylacetat, Isopropylacetat und Propylformiat verwendet werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet,

daß als Pufferlösung eine Phosphatpufferlösung, eine Citratpufferlösung oder eine Tris(hydroxymethyl)aminomethanlösung eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet,

daß die gepufferte Wirkstofflösung eine pH-Wert zwischen 6,0 bis 8,0 aufweist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet,

daß als Polymer Resomer® eingesetzt wird, vorzugsweise Resomer® RG-756 oder Resomer® RG-858.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,

dadurch gekennzeichnet,

daß als Wirkstoff Humanserumalbumin, Peptide, Proteine, Interferone, Betaseron® , Insulin, LHRH-Antagonisten oder deren Analoga eingesetzt werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff

a) DesA(2)Nal-beta Ala-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH_2

b) DesA(2)Nal-Gly-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH_2

oder

c) Ac-DNal-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DLys(Mor)-Leu-Lys(Mor)Pro-DAla-NH_2

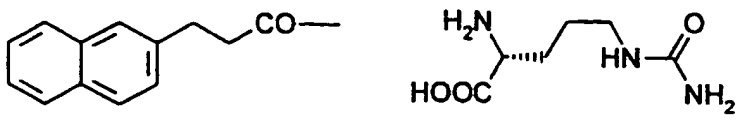
Verwendung finden.

9. Verfahren nach einem der Ansrpüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Entfernung des Lösungsmittels bzw. Lösungsmittelgemisches, sowie des gegebenenfalls an der Partikeloberfläche anhaftenden Wirkstoffs und/oder Tensids in einer "cross-flow" Filtration erfolgt.

10. Morphologisch einheitliche Mikrokapseln mit einem Beladungsgrad zwischen 3 bis 30 Gew.% und einem Durchmesser 200 nm bis 500µm hergestellt nach dem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 9.

11. Mikrokapseln gemäß Anspruch 10 mit einem Durchmesser zwischen 0,2 bis 8 µm.

Fig. 1

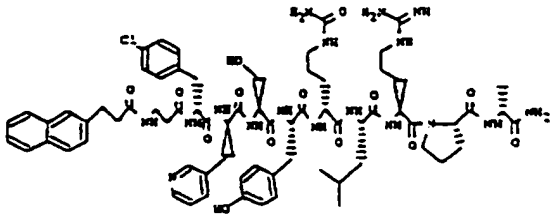


DesANal(2) D-Cit

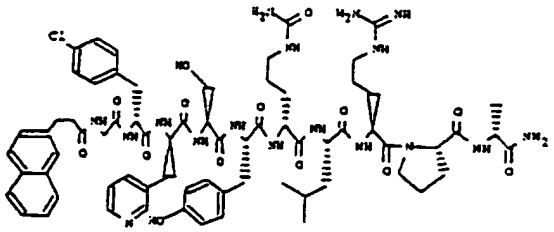
Fig. 2

Chemische Strukturen der Peptide a) bis c)

a) DesA(2)Nal-beta Ala-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-



b) DesA(2)Nal-Gly-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DCit-Leu-Arg-Pro-DAla-NH_2



c) Ac-DNal-DCpa-DPal-Ser-Tyr-DLys(Mor)-Leu-Lys(Mor)Pro-DAla-NH_2

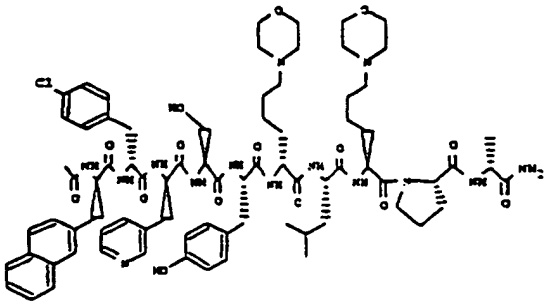


Fig. 3

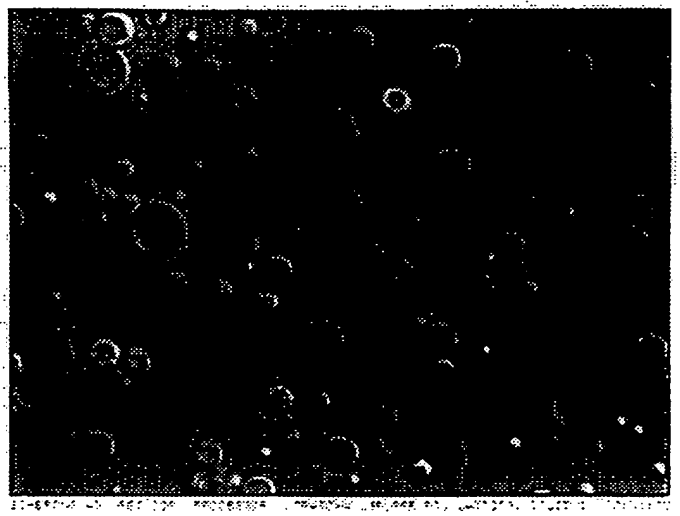


Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In* tional Application No
PCT/EP 96/04701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/16 A61K9/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 442 671 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 21 August 1991 see claims 12-14 see page 2, line 49 - page 4, line 2 see page 4, line 28 - page 5, line 10 see page 5, line 24 - line 28 ---	1-7,10, 11
X	EP 0 190 833 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 13 August 1986 see claims 1,6-10 see the whole document -----	1-7,10, 11

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 March 1997	17.03.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Ventura Amat, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int ational Application No
PCT/EP 96/04701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 442671 A	21-08-91	AT 123413 T	15-06-95
		CA 2036089 A	14-08-91
		DE 69110150 D	13-07-95
		DE 69110150 T	25-01-96
		ES 2073117 T	01-08-95
		FI 96278 B	29-02-96
		HK 188095 A	22-12-95
		JP 4321622 A	11-11-92
		LT 441 A,B	25-11-94
		LV 10041 B	20-10-94
		RU 2018306 C	30-08-94
		US 5480656 A	02-01-96
EP 190833 A	13-08-86	CA 1260395 A	26-09-89
		HK 137793 A	24-12-93
		IE 58930 B	01-12-93
		JP 7020859 B	08-03-95
		JP 62201816 A	05-09-87
		SG 134693 A	31-03-94
		US 4954298 A	04-09-90
		US 5330767 A	19-07-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04701

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K9/16 A61K9/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 442 671 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 21.August 1991 siehe Ansprüche 12-14 siehe Seite 2, Zeile 49 - Seite 4, Zeile 2 siehe Seite 4, Zeile 28 - Seite 5, Zeile 10 siehe Seite 5, Zeile 24 - Zeile 28 ---	1-7,10, 11
X	EP 0 190 833 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 13.August 1986 siehe Ansprüche 1,6-10 siehe das ganze Dokument -----	1-7,10, 11

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10.März 1997	17.03.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Ventura Amat, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentli. .gen, die zur selben Patentfamilie gehören

In: .tionales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04701

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 442671 A	21-08-91	AT 123413 T	15-06-95
		CA 2036089 A	14-08-91
		DE 69110150 D	13-07-95
		DE 69110150 T	25-01-96
		ES 2073117 T	01-08-95
		FI 96278 B	29-02-96
		HK 188095 A	22-12-95
		JP 4321622 A	11-11-92
		LT 441 A,B	25-11-94
		LV 10041 B	20-10-94
		RU 2018306 C	30-08-94
		US 5480656 A	02-01-96
EP 190833 A	13-08-86	CA 1260395 A	26-09-89
		HK 137793 A	24-12-93
		IE 58930 B	01-12-93
		JP 7020859 B	08-03-95
		JP 62201816 A	05-09-87
		SG 134693 A	31-03-94
		US 4954298 A	04-09-90
		US 5330767 A	19-07-94